

# 风湿清对成纤维样滑膜细胞 OPG, RANKL, TNF- $\alpha$ 及 IL-17 表达的影响

孔祥英<sup>1</sup>, 吴文斌<sup>1</sup>, 苏晓慧<sup>1</sup>, 吴振宇<sup>2</sup>, 姜泉<sup>2</sup>, 林娜<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;

2. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053)

**[摘要]** 目的: 观察风湿清(FSQ)含药血清对类风湿关节炎患者成纤维样滑膜细胞(RA-HFLS)增殖及骨保护素(OPG)、细胞核因子 $\kappa$ B受体活化因子配基(RANKL)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )及白介素-17(IL-17)表达的影响,初步探讨FSQ治疗类风湿性关节炎(RA)的机制。方法:不同体积分数的FSQ含药血清与RA-HFLS共孵育,采用3-(4,5-二甲基-2-基)-5-(3-羧基甲基苯基)-2-(4-磺酸苯基)-2H-四氮唑(MTS)比色法检测细胞增殖活性,ELISA法检测培养液上清中OPG、IL-17及TNF- $\alpha$ 浓度,Western blot法检测RA-HFLS中RANKL的蛋白表达。结果:5%~20%FSQ含药血清可以浓度依赖性抑制RA-HFLS的增殖;RA-HFLS可分泌一定水平的OPG,FSQ含药血清可浓度依赖性促进OPG的分泌;同时FSQ含药血清可显著抑制RANKL的表达;FSQ含药血清还可显著抑制由炎症因子诱导的RA-HFLS中IL-17及TNF- $\alpha$ 的分泌,并呈现一定的浓度依赖性。结论:FSQ能显著抑制RA-HFLS的增殖,促进OPG分泌,并抑制RANKL,IL-17和TNF- $\alpha$ 的水平,这可能是FSQ抑制骨破坏治疗RA的部分作用机制。

**[关键词]** 类风湿关节炎;成纤维样滑膜细胞;风湿清;骨破坏

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0287-04

## Effects of Fengshiqing on Expression of OPG/RANKL, TNF- $\alpha$ and IL-17 in Fibroblast-like Synoviocytes

KONG Xiang-ying<sup>1</sup>, WU Wen-bin<sup>1</sup>, SU Xiao-hui<sup>1</sup>, WU Zhen-yu<sup>2</sup>, JIANG Quan<sup>2</sup>, LIN Na<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Guanganmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of Fengshiqing (FSQ) containing serum on the expression of osteoprotegerin (OPG), receptor activator for nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-17 (IL-17) in human fibroblast-like synoviocytes of rheumatoid arthritis (RA-HFLS). **Method:** RA-HFLS were cultured with different volume ration of FSQ in serum. Cell proliferation was evaluated by MTS assay. The expression of OPG, IL-17 and TNF- $\alpha$  in cell culture supernatant was examined by ELISA, and expression of RANKL was detected by Western blot analysis. **Result:** FSQ containing serum could obviously decrease the RA-HFLS viability in a dose-dependent style. The RA-HFLS could secret certain level of OPG, and FSQ containing surum could promote the secretion of OPG with a dose-dependent style. FSQ containing surum also suppressed the expression of RANKL, IL-17 and TNF- $\alpha$ . **Conclusion:** FSQ has an notable inhibiting effect on proliferation of RA-HFLS, increasing the level of OPG, and suppressing expression of RANKL, IL-17 and TNF- $\alpha$ , which may be a part of the mechanism of FSQ for rheumatoid arthritis.

**[Key words]** rheumatoid arthritis; fibroblast-like synoviocytes; Fengshiqing; bone destruction

**[收稿日期]** 20120820(500)

**[基金项目]** 重大新药创制项目(2009ZX09301-005-007);国家自然科学基金项目(30873250)

**[第一作者]** 孔祥英,博士,助理研究员,从事中药药理研究,E-mail:kongx0051@163.com

**[通讯作者]** \*林娜,博士,研究员,博导,从事中药药理与中药药性研究,Tel:010-64014411-2869, E-mail:linna888@163.com

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以关节滑膜组织炎性增生、软骨进行性破坏为特征的慢性自身免疫性疾病。风湿清 (FSQ) 是广安门医院风湿科治疗 RA 的经验方, 具清热祛湿、活血止痛的功效, 单独或者早期联合应用甲氨蝶呤均可以有效控制疾病活动度, 延缓骨破坏进程, 改善风湿病情<sup>[1-4]</sup>。为探讨其作用机制, 本研究拟采用血清药理学方法, 观察 FSQ 对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞 (human fibroblast-like synoviocytes of rheumatoid arthritis, RA-HFLS) 中骨破坏调控因子骨保护素 (osteoprotegerin, OPG) 和细胞核因子  $\kappa$ B 受体活化因子配基 (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand, RANKL)、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 及白细胞介素-17 (IL-17) 的影响。

## 1 材料

**1.1 细胞、药物与试剂** RA-HFLS 及专用培养基 (Cell Applications INC), FSQ (由苍术、黄柏、丹参、赤芍、土茯苓、萆薢等组成, 常规水煎 2 次, 合并 2 次水煎液浓缩至含生药  $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 由广安门医院提供, IL-1 (Peprotech 公司), MTS (Promega 公司), OPG, IL-17, TNF- $\alpha$  ELISA 检测试剂盒 (R&D 公司), 兔抗 RANKL 抗体 (SANTA CRUZ 公司), 辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 及增强型化学发光 (ECL) 试剂 (北京中杉金桥技术有限公司), Bradford 试剂盒 (普利莱基因技术有限公司)。

**1.2 仪器** 低温高速离心机 (Sigma 公司), 酶标仪 (Biorad 公司), DYY-6C 型电泳仪 (北京市六一仪器厂)。

**1.3 动物** SD 大鼠, 清洁级, 体重 300 g 左右, 由北京大学医学部动物中心提供, 许可证号 SCXK (京)2006-0008。

## 2 方法

**2.1 FSQ 含药血清的制备** 大鼠随机分为正常对照组和 FSQ 组, 各 20 只, FSQ 水煎液 ig 给药,  $24 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  (给药组按成人临床等效剂量的 10 倍 ig, 对照组给予等容量蒸馏水), 2 次/d, 连续 5 次。末次 ig 前禁食 12 h, 不禁水, 末次 ig 1 h 后, 乌拉坦麻醉, 腹主动脉采血,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱静置 1 h 后  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1} \times 15 \text{ min}$  离心, 分离血清,  $56 \text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴灭活 30 min,  $0.22 \text{ } \mu\text{m}$  抽滤除菌, 分装,  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**2.2 细胞培养** RA-HFLS 常规培养于含  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  L-谷氨酰胺、 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  青霉素和  $80 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$

链霉素的滑膜细胞专用培养基中, 置  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $5\% \text{ CO}_2$  饱和湿度培养箱内培养。为保证细胞有良好状态, 实验用细胞皆为 4 代到 8 代。

**2.3 MTS 法检测 FSQ 含药血清对 RA-HFLS 增殖的影响** 取对数生长期 RA-HFLS 以  $3.5 \times 10^3$  个/孔细胞接种于 96 孔培养板。培养 6 h 细胞贴壁后分设以下几组: 正常鼠血清、不同体积分数 FSQ 含药血清 (5%, 10%, 15%, 20%) 组, 每组设 3 个平行孔, 继续培养 48 h 后, 每孔吸弃上清  $100 \text{ } \mu\text{L}$ , 加 MTS  $20 \text{ } \mu\text{L}$ , 孵育 4 h, 振荡摇匀后, 于酶联免疫检测仪  $490 \text{ nm}$  处测定各孔吸光度 (A)。设空白对照组细胞增殖活力为 100%, 按公式计算 FSQ 对 RA-HFLS 的增殖抑制率 (%), 实验重复 3 次。

$$\text{抑制率} = [1 - (A_{\text{实验组}} / A_{\text{模型组}})] \times 100\%$$

**2.4 ELISA 法检测培养上清中 TNF- $\alpha$ , IL-17 及 OPG 水平** 将培养的 RA-HFLS 胰酶消化, 接种后 24 h 待细胞完全贴壁后, 除正常对照组外, 均加入 IL-1 ( $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 诱导, 分别加相应 FSQ 含药血清, 使其终体积分数分别为 5%, 10%, 15%, 正常和 IL-1 组仅添加相同体积分数的正常鼠血清, 24 h 收集细胞上清液, 以 ELISA 方法检测 TNF- $\alpha$  和 IL-17 的含量。分别于培养 3, 7, 10, 14, 17, 21 d 收集上清,  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  保存, 以 ELISA 方法检测 OPG 含量。具体操作参照试剂盒说明。

**2.5 Western blot 方法检测 RANKL 表达水平** 细胞接种及分组同 2.4, 培养 21 d 时收集细胞, 加 RIPA 裂解液于冰上裂解 1 h,  $14000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  离心 15 min, 提取细胞总蛋白, Bradford 法测蛋白浓度, 每组取  $30 \text{ } \mu\text{g}$  蛋白上样, 10% SDS-PAGE 分离蛋白, 电转移至 PVDF 膜, 室温封闭 2 h, 加入抗 RANKL (1:200 稀释),  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, TBST 洗膜, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 2 h, TBST 洗膜, 加 ECL 孵育、显影、定影。图像扫描后用 AlphaEaseFC 凝胶成像分析软件进行分析, 确定杂交条带的吸光度积分值 (设每一次蛋白印迹对照组条带的吸光度积分值相对值为 1)。实验重复 3 次。

**2.6 数据处理** 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对 RA-HFLS 增殖的影响** 倒置显微镜下观察 RA-HFLS 呈菱形或梭形, 细胞状态良好, 加入 FSQ 含药血清作用 48 h 细胞数明显减少, 并呈现不同程度的变形, 表现为突触回缩, 细胞由梭形变为不规则形。MTS 方法检测, 与对照组相比, 5% ~ 20% FSQ

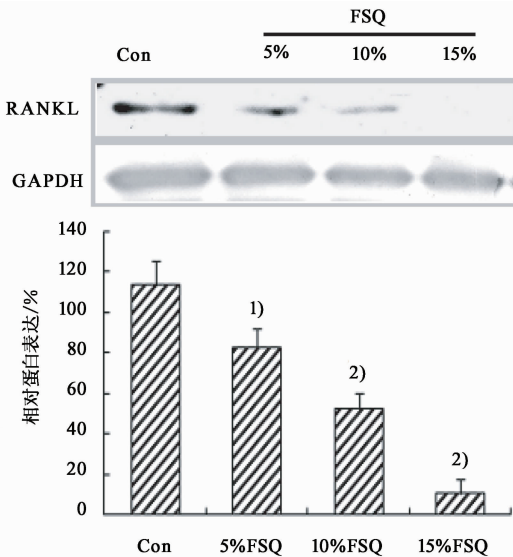
含药血清组 A 明显降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。提示 FSQ 可显著抑制 RA-HFLS 的增殖。见表 1。

表 1 FSQ 抑制 RA-HFLS 的增殖 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

分组	含药血清 体积分数/%	A	抑制率 /%
对照	-	1.322 $\pm$ 0.113	-
FSQ	5	1.059 $\pm$ 0.077 <sup>1)</sup>	19.8
	10	1.035 $\pm$ 0.053 <sup>1)</sup>	21.7
	15	1.016 $\pm$ 0.070 <sup>1)</sup>	23.1
	20	1.008 $\pm$ 0.011 <sup>2)</sup>	23.8

注:与对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.2 对 RANKL 表达及 OPG 分泌的影响** RA-HFLS 表达一定水平的 RANKL, FSQ 含药血清可显著下调 RANKL 的分泌, 呈现明显的浓度依赖关系 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 见图 1。随着培养时间的延长, OPG 的分泌水平呈现上升的趋势。与对照组相比, 不同体积分数 FSQ 含药血清均可有效上调 OPG 的分泌, 其上调开始时间及程度均呈现明显的浓度依赖性, 见图 2。



与对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$

图 1 FSQ 含药血清对 RA-HFLS 中 RANKL 的表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

**3.3 对 TNF- $\alpha$  和 IL-17 水平的影响** RA-HFLS 可以分泌一定水平的 TNF- $\alpha$  [(23.9  $\pm$  2.5 ng  $\cdot$  L<sup>-1</sup>)] 和 IL-17 [(46.9  $\pm$  2.7 ng  $\cdot$  L<sup>-1</sup>)], IL-1 诱导可显著提高 TNF- $\alpha$  和 IL-17 在 RA-HFLS 中的分泌水平 ( $P < 0.01$ )。与 IL-1 (10  $\mu$ g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 诱导组相比, FSQ 含药血清可显著降低 RA-HFLS 培养上清液中 TNF- $\alpha$  和 IL-17 的水平 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 且呈现明显的浓度依赖性, 尤其 15% FSQ 含药血清可

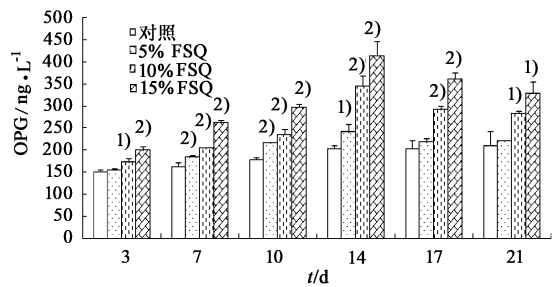


图 2 FSQ 含药血清对 RA-HFLS 中 OPG 分泌的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ) 将 TNF- $\alpha$  降低到接近于未诱导水平。提示 FSQ 含药血清可以显著抑制 RA-HFLS 中 TNF- $\alpha$  和 IL-17 的分泌, 见表 2。

表 2 FSQ 含药血清对 IL-1 诱导的 RA-HFLS 培养上清中

TNF- $\alpha$  及 IL-17 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ) ng  $\cdot$  L<sup>-1</sup>

分组	含药血清 /%	TNF- $\alpha$	IL-17
对照	-	23.9 $\pm$ 2.5	46.9 $\pm$ 2.7
IL-1 诱导	-	50.2 $\pm$ 4.7 <sup>1)</sup>	97.3 $\pm$ 4.7 <sup>2)</sup>
FSQ	5	40.2 $\pm$ 2.3	93.3 $\pm$ 1.4
	10	33.3 $\pm$ 3.8 <sup>3)</sup>	82.1 $\pm$ 2.9 <sup>4)</sup>
	15	29.0 $\pm$ 1.2 <sup>3)</sup>	74.4 $\pm$ 2.6 <sup>4)</sup>

注:与对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与 IL-1 诱导组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ 。

#### 4 讨论

RA 是临床上常见的致残性、自身免疫性疾病, 骨破坏是其致残的主要原因。现代风湿病学认为, RA 骨侵蚀伴随 RA 整个病程, 并且在其早期骨丢失已发生, 往往是病程的最初 2 年病情处于活动期时, 骨侵蚀发生的速度最快<sup>[5]</sup>。且一旦骨质遭到破坏, 则意味着其病理改变进入不可逆期, 因此我们从骨破坏调控因子的角度, 研究 FSQ 抗 RA 的作用机制。

破骨细胞是骨破坏及吸收的效应细胞, 虽然有多种激素、细胞因子参与了破骨细胞分化过程的调节, 但目前仍认为 RANKL 是前体破骨细胞分化、成熟的启动因子。RANKL 与其受体 RANK 结合, 可以促进破骨细胞分化、刺激破骨细胞活化和提高破骨细胞存活, 抑制破骨细胞凋亡<sup>[6]</sup>。OPG 则竞争性地与 RANKL 结合, 阻止 RANKL 与 RANK 的结合, 抑制破骨细胞的分化和活化并提高破骨细胞凋亡, 从而抑制骨吸收, 在骨代谢调节中起着关键性作用。临床研究发现, RA 患者滑膜组织 RANKL 水平与骨破坏程度密切正相关<sup>[7-8]</sup>。本研究发现, FSQ 可以显著抑制 RANKL 的表达; 此外 FSQ 可以显著促进 OPG 的分泌, 尤其是培养 14 d 时, FSQ 高浓度组基

本接近基础水平的 2 倍。提示 FSQ 可能抑制破骨细胞的分化,这与临床实践中我们观察到的 FSQ 显著改善 RA 患者 X 射线摄片所见病变,延缓骨破坏进程相符<sup>[1-2]</sup>。

最新研究表明,IL-17 也是促进 RA 关节骨破坏的重要细胞因子。IL-17 促进 RA 骨破坏的机制可能与它诱导了 RANKL 和 MMP 的表达,进而刺激破骨细胞的分化与活化有关<sup>[9]</sup>。其次 IL-17 还可增加成骨细胞和间充质细胞 RANKL 的表达,刺激破骨细胞前体发育为成熟的破骨细胞<sup>[10]</sup>。再者,也可以直接刺激成熟的破骨细胞发挥作用。此外,IL-17 还诱导 TNF- $\alpha$  的产生并与其有协同作用<sup>[11]</sup>。TNF- $\alpha$  也可通过多种机制导致关节骨破坏。一方面可激活 RANKL,直接促进破骨细胞的增殖和分化,并可通过作用于 TNF- $\beta$  间接刺激破骨细胞形成。另一方面可通过 P21 激活激酶 1 (p21-activated kinase, PAK1) 诱导 MMP-9 表达,从而参与软骨和骨破坏<sup>[12]</sup>。可见,IL-17 和 TNF- $\alpha$  对炎性部位的持续性细胞浸润和诱导骨破坏具有一定的作用,是骨质吸收和骨质破坏的主要细胞因子,导致炎症反应的持续发生和软骨与骨的渐进性破坏<sup>[13-14]</sup>。我们的结果也发现 IL-1 可以显著诱导 RA-HFLS 分泌 IL-17 及 TNF- $\alpha$ ,后者可以进一步促进 RA-HFLS 的炎性增殖。FSQ 则可显著抑制 IL-17 及 TNF- $\alpha$  的分泌,这样一方面可以直接抑制他们各自的直接促炎及骨破坏作用,另一方面则抑制他们之间的相互协同作用。这与上述的 FSQ 抑制 RANKL 的表达,并促进 OPG 分泌相符,并最终起到骨保护作用。

综上,本研究显示 FSQ 可显著抑制细胞因子 IL-17 及 TNF- $\alpha$  的分泌,同时调节破骨细胞分化因子 RANKL 及 OPG 的表达,提示抑制滑膜细胞滑膜炎症及破骨细胞的分化及活化可能是 FSQ 治疗 RA 的分子机制之一。相关研究结果为阐明 FSQ 治疗 RA 的机制提供了初步的科学依据。

#### [参考文献]

[1] 周新尧,王雷,余卫,等. 清热活血方药治疗类风湿关节炎 1 年后双手 X 线变化临床观察[J]. 中国骨伤, 2011,24(12):992.  
[2] 姜泉,殷海波,罗成贵,等. 清热活血方药治疗类风湿关节炎骨破坏 2 年期放射学研究[J]. 世界中西医结合杂志,2012,7(4):334.  
[3] 姜泉,冯兴华,王承德,等. 清热活血方治疗类风湿关节炎患者 71 例临床观察[J]. 中医杂志,2012,53

(6):488.

[4] 姜泉,曹炜,唐晓颇,等. 清热活血方药治疗活动期类风湿关节炎的临床疗效观察[J]. 世界中西医结合杂志,2010,5(7):588.  
[5] Mikuls T, Moreland L. Predicting outcomes in early rheumatoid arthritis[J]. Curr Rheumatol Rep, 2002, 4: 193.  
[6] Singh P P, van der Kraan A G, Xu J, et al. Membrane-bound receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) activity displayed by osteoblasts is differentially regulated by osteolytic factors[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 422(1):48.  
[7] Rooney T, Edwards CK 3rd, Gogarty M, et al. Synovial tissue rank ligand expression and radiographic progression in rheumatoid arthritis: observations from a proof-of-concept randomized clinical trial of cytokine blockade[J]. Rheumatol Int, 2010, 30(12):1571.  
[8] Scott D L. Prognostic factors in early rheumatoid arthritis[J]. Rheumatology (Oxford), 2000, 39(suppl 1): 24.  
[9] Ju J H, Cho M L, Jhun J Y, et al. Oral administration of type-II collagen suppresses IL-17-associated RANKL expression of CD<sup>4+</sup> T cells in collagen-induced arthritis [J]. Immunol Lett, 2008,117(1):16.  
[10] Kotake S, Yago T, Kawamoto M, et al. Role of osteoclasts and interleukin-17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: crucial 'human osteoclastology' [J]. J Bone Miner Metab, 2012, 30(2):125.  
[11] Sato K, Suematsu A, Okamoto K, et al. IL-17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction[J]. J Exp Med, 2006, 203(12): 2673.  
[12] O'Gradaigh D, Ireland D, Bord S, et al. Joint erosion in rheumatoid arthritis: interactions between tumour necrosis factor alpha, interleukin 1, and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) regulate osteoclasts [J]. Ann Rheum Dis, 2004, 63(4):354.  
[13] Schett G, Middleton S, Bolon B, et al. Additive bone-protective effects of anabolic treatment when used in conjunction with RANKL and tumor necrosis factor inhibition in two rat arthritis models [J]. Arthritis Rheum, 2005, 52(5):1604.  
[14] Goldring M B, Marcu K B. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases[J]. Arthritis Res Ther, 2009,11(3):224.

[责任编辑 何伟]